

令和元年6月3日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26291053

研究課題名(和文)細胞外微小環境を介した体軸形成原理の解明

研究課題名(英文)Studies on roles of extracellular microenvironments in the body axis formation

研究代表者

松尾 勲 (Matsuo, Isao)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・病因病態部門・部長

研究者番号：10264285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胚の前後軸形成過程で、基底膜などによって構成される細胞外環境が、形態形成に与える影響を解明することを目的に行った。胚と子宮内膜との境界に形成されるライヘルト膜とよばれる基底膜の構成分子、細胞外マトリクス分子の発現を着床前後時期に解析したところ、ジストログリカンとラミニンが先行して分布することが分かった。そこでラミニン遺伝子の欠損胚の表現型を解析したところ、ライヘルト膜とよばれる基底膜の形成不全を示し、胚形態が大きく変形し、致死となっていた。更に、遺伝子欠損胚の発生はほぼ正常に進行していたことから、胚と子宮との境界に存在する基底膜が胚の形態形成に必要な機能を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎盤を持つ哺乳動物の胚発生は、母親の子宮内で進行するという独特な特徴を持っている。子宮内環境は、母体と胎児の間の栄養・老廃物やガスの交換といった機能以外にも、胚・胎児の発生に重要な機能を担っていると考えられているが、明らかになっていない。本研究では、胚と子宮との境界に存在する特殊な基底膜が、胚を取り囲むことで、子宮から胚を保護する機能を担っていることを強く示唆している。本研究成果は、正常な着床維持と胚発生には、胚と子宮との境界に形成される基底膜構造が必要不可欠であることを意味している。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this project is to identify if extracellular microenvironments such as basement membrane can control early morphogenesis during mouse anterior-posterior axis formation. Initially, developmental profiles of Reichert's membrane, a specialized basement membrane, which is located at the interface between the embryo proper and uterus, were examined with expression of extracellular matrix molecules. These studies identified that distribution of Dystroglycan and Laminin precede the deposition of other ECM. Then, by analyzing phenotypes of the laminin $\alpha 1$ -deficient embryos, the basal lamina was not formed and embryonic shape was severely deformed in Lama1-deficient embryos. Moreover, given that apparently normal cell specification in the mutant embryos, basement membrane located between the embryo and uterus is suggested to play a crucial role on embryonic morphogenesis in a non-cell autonomous manner.

研究分野：哺乳動物発生遺伝学

キーワード：micro-environments anterior-posterior axis mouse morphogenesis basement membrane basement membrane extracellular matrix uterus

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の初期胚は、他の脊椎動物胚に比べて、調節性が高いことが知られている。つまり、ほ乳類胚の受精卵では、母性因子による背側の決定因子などは、分布しておらず、発生が進行していく過程で、周辺の細胞外（細胞表面や基底膜）に分布した細胞外マトリクス (ECM) 分子など（細胞外微小環境とよぶ）によって、細胞運命が、非自律的に制御されている。最近、研究代表者等の成果から、細胞表面や基底膜に分布する ECM 分子を介した様々な情報が、選択的に特定細胞群に伝達されることを通じて、マウス初期胚の発生現象が制御されていることが分かってきた。このような ECM 分子には、コラーゲン、プロテオグリカン、ラミニンやフィブロネクチンなどの糖タンパク質があげられる。例えば、プロテオグリカンは、FGF, BMP, Wnt などの分泌性成長因子と相互作用してモルフォゲン勾配の制御や、他の受容体と相互作用して細胞移動に関与することなどが示唆されている。また、体性幹細胞では、このような細胞外微小環境が、Niche として働いていることが知られている。しかし、幹細胞維持は、恒常的・安定的に起こる現象で、初期発生のように数時間以内に細胞の配置や性質が大きく変化する状況とは異なっている。実際、研究代表者等による発現解析から、マウス胚の前後軸形成期では、数時間以内にダイナミックに ECM 分子の分布が変化し、細胞挙動を制御していることが分かってきた (図 1)。しかし、どのような ECM 分子が、どのように分布して、どのような細胞運命 (移動や分化) 決定に働いているのか、十分な解析が進んでいない。

2. 研究の目的

哺乳動物初期胚においては、周辺の細胞表面や基底膜などに存在する ECM 分子と分泌性シグナル因子が構成する細胞外微小環境を介して細胞・組織の挙動や運命が支配されている。特に前後軸形成過程では、短時間で細胞集団の配列や胚内での位置がダイナミックに変化しているが、ECM の分子の実体や ECM が担っている細胞非自律的な機能については不明な点が多い。本研究では、マウス前後軸形成過程において、ECM 分子などによって構成される環境が、胚の形態形成にどのような影響を与えるのかを解明することを目的に研究を行った。

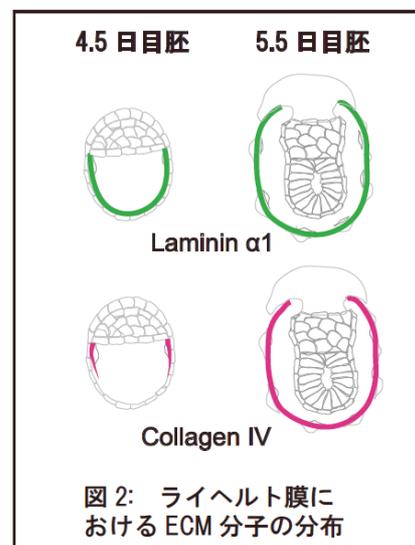
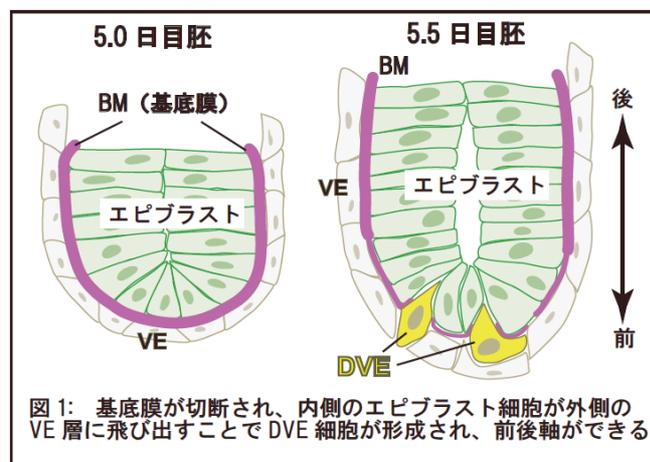
3. 研究の方法

前後軸形成過程において、ECM 分子の発現について mRNA レベルを *in situ* ハイブリダイゼーション法で、タンパク質レベルを特異的な抗体を用いた免疫染色法にて解析した。実際、Collagen IV 遺伝子欠損マウス胚ではマウス胚の初期発生に大きな異常が観察されていないことから、初期胚性致死を示す Collagen IV 以外の ECM 分子について遺伝子欠損変異マウスの表現型を解析することとした。具体的には、ECM を構成する Laminin $\alpha 1$ 遺伝子と Dystroglycan の糖鎖修飾に働く Fukutin 遺伝子を欠損した変異マウスを導入し、前後軸形成時期における基底膜の形成状態や胚の形態形成に与える影響を組織形態レベル、分子マーカーレベルで解析した。

4. 研究成果

(1) 野生型胚における ECM 分子の発現解析

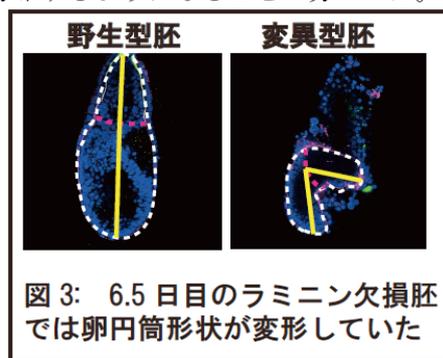
既知の ECM タンパク質である、Collagen IV, Laminin, Perlecan, Nidogen, Dystroglycan などに対する特異的抗体を用いて免疫染色法を行った。その結果、前後軸形成が確立する着床前後において、これら ECM 分子が特徴的な発現変動と局在分布を示すことが分かった。まず、胚の着床時には、Dystroglycan 分子が栄養外胚葉の基底側に分布し、その発現にそって Laminin 分子が栄養外胚葉全体に最初に沈着していた。Collagen IV と Nidogen は、この Laminin 分子の発現に沿ってより polar 側から mural 側へ向けて、栄養外胚葉の基底膜に徐々に沈着していった (図 2)。更に着床 1~2 日後の前後軸が完成する時には、これらの ECM 分子は子宮と胚の境界で完全に胚を包むように沈着していた。この構造について透過型電子顕微鏡像を撮影し、観察すると、数百 nm の肥厚した基底膜構造を形成していた。次に、これらの ECM 分子の転写産物の発現を解析するため、antisense cDNA probe を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。解析の結果 Collagen IV や Laminin $\alpha 1$ の遺伝子産物は胚体



外領域となる原始内胚葉や壁側内胚葉でのみ発現し、栄養外胚葉や将来胚体領域となる内部細胞塊やエピプラストなどの胚本体側ではほとんど発現していないことが分かった。つまり、ECM分子は、産生される細胞と分布する細胞とが異なっており、細胞外に分泌されたECM分子は、細胞外で移動、輸送され、アンカータンパク質に沿って分布することが分かった。

(2) *Laminin a1* 遺伝子変異マウスの表現型解析

Laminin a1 (*Lama1*) 遺伝子欠損マウス胚 (*Laminin* α 1 の遺伝子) は、胚性致死を示すが、どのような異常によるのかその詳細は明らかにされていない。そこで、着床前後のホモ欠損胚を用いて、光学顕微鏡レベル及び電子顕微鏡レベルでの組織学的解析、*in situ* ハイブリダイゼーションや免疫染色による発現解析を行った。着床直後の野生型マウス胚は、ライヘルト膜とよばれる基底膜 (ECM 分子から構成されている) で覆われている。解析の結果、*Lama1* 欠損胚では、着床後ライヘルト膜が電子顕微鏡レベルでも形成されないこと、胚性 5.5 日目まで (着床後 1 日目) はほぼ正常に発生するが、胚性 6.5 日目では胚全体の形状が折れ曲がり、卵円筒型へと伸長せず、重度の形態異常を示すことが分かった (図 3)。次に、*Laminin* 欠損胚では、野生型と比較して着床後 2 日以内に子宮脱落膜と触れることで、胚形態が大きく変形することを定量的に示した。更に、*Lama1* 欠損胚においてライヘルト膜を構成する他の ECM 分子の発現を解析したところ、原始内胚葉や壁側内胚葉において、Collagen IV を始めとする他の ECM 分子の沈着がほとんど観察されなかった。これらの結果は、マウス着床期における基底膜の沈着に *Laminin a1* が必須であることを示唆している。



(3) *Fukutin* 遺伝子変異マウスの表現型解析

上記(1)の発現解析から *Laminin* 分子と細胞外で結合する *Dystroglycan* は、基底膜沈着のキーとなっていることが強く示唆された。そこで、*Dystroglycan* と *Laminin* との結合に重要な糖鎖構造形成に関わる *Fukutin* 遺伝子を欠損した胚について解析をすすめた。*Fukutin* ヘテロ変異マウスは、ほぼ正常に発生が進行しており、ライヘルト膜では、ECM の沈着が少し低下していたものの、胚全体の形状に顕著な異常は見られなかった。一方、*Fukutin* 遺伝子のホモ変異マウス胚は、胚性致死を示し、免疫染色法で解析したところ、ライヘルト膜が局所的に破損したり、穴があいていること、また、胚全体が大きく変形することが分かった。これらの結果は、胚と子宮の境界に存在して、胚を取り囲んでいる基底膜構造が、胚の発生・成長に必須な機能を担っていることを強く支持している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Yu Kitadate, David J. Jörg, Moe Tokue, Ayumi Maruyama, Rie Ichikawa, Soken Tsuchiya, Eri Segi-Nishida, Toshinori Nakagawa, Aya Uchida, Chiharu Kimura-Yoshida, Seiya Mizuno, Fumihiro Sugiyama, Takuya Azami, Masatsugu Ema, Chiyo Noda, Satoru Kobayashi, Isao Matsuo, Yoshiakira Kanai, Takashi Nagasawa, Yukihiko Sugimoto, Satoru Takahashi, Benjamin D. Simons, Shosei Yoshida “Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche.” *Cell Stem Cell* 24, 79-92 (2019) doi: 10.1016/j.stem.2018.11.013 (査読あり)
- ② Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Masa-aki Nakaya, Takeomi Mizutani, Isao Matsuo “Cytoplasmic localization of GRHL3 upon epidermal differentiation triggers cell shape change for epithelial morphogenesis.” *Nature Communications* 9(1), 4059 (2018) doi: 10.1038/s41467-018-06171-8. (査読あり)
- ③ 松尾 勲 「マウス胚前後軸形成において力学的環境が果たす役割。」 大阪母子医療センター雑誌 34 (1), 1-11 (2018) (査読あり)
- ④ Isao Matsuo, Ryuji Hiramatsu “Mechanical perspectives on the anterior-posterior axis polarization of mouse implanted embryos.” *Mechanisms of Development* 144 (PtA), 62-70 (2017) doi: 10.1016/j.mod.2016.09.002. (査読あり)
- ⑤ Hidenori Nishihara, Naoki Kobayashi, Chiharu Kimura-Yoshida, Kuo Yanc, Olga Grishinac, Qiong Dinga, Akiko Nakanishi, Takeshi Sasaki, Mika Hirakawa, Kenta Sumiyama, Yasuhide Furuta, Victor Tarabykin, Isao Matsuo, Norihiro Okada “Coordinately co-opted multiple transposable elements constitute an enhancer for *wnt5a* expression in the mammalian secondary palate.” *PLOS Genetics* (2016) 12(10):e1006380. doi: 10.1371/journal.pgen.1006380. (査読あり)

⑥ Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Kristina Ellwanger, Christof Niehrs, Isao Matsuo “Fate specification of neural plate border by canonical Wnt and *Grhl3* is crucial for neural tube closure.” *EBioMedicine* 2, 513-527 (2015) doi: 10.1016/j.ebiom.2015.04.012 (査読あり)

⑦ Isao Matsuo, Chiharu Kimura-Yoshida “Extracellular distribution of diffusible growth factors controlled by heparin sulfate proteoglycans during mammalian embryogenesis.” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369, 20130545 (2014) doi: 10.1098/rstb.2013.0545. (査読あり)

[学会発表] (計 21 件)

① 上田 陽子、吉田 千春、爪 麻美、持田 京子、松尾 勲 「マウス着床後胚におけるライヘルト膜の力学的機能の解析」 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年

② 木村-吉田 千春、持田 京子、中谷 雅明、水谷 武臣、松尾 勲 「GRHL3 因子は核から細胞質へ局在を変えることで、機能的で弾性率に富んだ上皮細胞を誘導する」 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年

③ 大桑 良菜、大塚 瑞希、住吉 麻実、小河 穂波、木村-吉田 千春、松尾 勲、渡邊 利雄 「マウス *Smad1*, *Smad2* 二重欠損胚は原腸形成期において異常を示す」 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年

④ Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Takeomi Mizutani, Isao Matsuo “GRHL3 triggers epithelial morphogenesis from differentiation in uncommitted ectodermal progenitors during neural tube” International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells 2018, 2018 年

⑤ Mami Tsume, Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Yoko Ueda, Isao Matsuo “Regulation of cell fate via BET family proteins in mouse preimplantation embryos” International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells 2018, 2018 年

⑥ 爪 麻美、木村-吉田 千春、持田 京子、松尾 勲 「BET ファミリータンパク質を介したマウス着床前胚の細胞運命制御」 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年

⑦ 木村-吉田 千春、持田 京子、水谷 武臣、松尾 勲 「神経管閉鎖時における *Grainyhead-like 3* 遺伝子発現表皮細胞の機能解析」 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年

⑧ 大塚 瑞希、大桑 良菜、住吉 麻美、増田 成美、小河 穂波、木村-吉田 千春、松尾 勲、渡邊 利雄 「小胞輸送を制御する Arf GTPase 活性化因子 SMAP1 と SMAP2 の二重欠損胚におけるエンドサイトーシス経路の異常」 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年

⑨ 松尾 勲、木村-吉田 千春 「マウス神経管閉鎖過程における *Grainyhead-like 3* の機能解析」 Wnt 研究会 2017, 2017 年

⑩ Chiharu Kimura-Yoshida, Isao Matsuo “Surface ectoderm specification of uncommitted ectodermal progenitors in the neural plate border is crucial for neural tube closure” 50th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2017.

⑪ Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Kristina Ellwanger, Christof Niehrs, Isao Matsuo “Fate specification of neural plate border by canonical Wnt signaling and *Grhl3* is crucial for mammalian neural tube closure” 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

⑫ Ryuji Hiramatsu, Isao Matsuo “Mechanical interaction among embryonic, extraembryonic and maternal tissues for the anterior-posterior axis formation in mouse embryos” EMBO work shop “Embryonic-Extraembryonic Interfaces” 2015 年

⑬ 渋川 幸直、山崎 奈津子、大門 江津子、木村-吉田 千春、持田 京子、松尾 勲、和田 芳直 「カルポニン 3 ノックアウトマウスの表現型解析」 BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会, 2015 年

- ⑭ 木村-吉田 千春、持田 京子、Kristina Ellwanger、Christof Niehrs、松尾 勲 「神経管閉鎖過程におけるカノニカル Wnt 経路と *Grhl3* 遺伝子を介した未分化前駆細胞から表皮への細胞運命決定機構」 BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会, 2015 年
- ⑮ Isao Matsuo, Chiharu Kimura-Yoshida, Ryuji Hiramatsu “External mechanical forces from the maternal tissues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in the early mouse embryo” International Symposium on Mechanobiology 2014, 2014 年
- ⑯ Isao Matsuo, Ryuji Hiramatsu, Kayo Shimokawa, Chiharu Kimura-Yoshida “Extracellular micro-environmental cues control specification of cell fate and behaviors in the early mouse embryo.” 27th Mouse Molecular Genetics Conference, 2014 年
- ⑰ Isao Matsuo, Chiharu Kimura-Yoshida, Ryuji Hiramatsu “Mechanical forces from the maternal tissues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in the mouse embryo” MBI-Japan Joint Symposium on Mechanobiology of Development and Multicellular Dynamics 2014 年
- ⑱ Isao Matsuo, Kayo Shimokawa, Ryuji Hiramatsu, Chiharu Kimura-Yoshida “The extracellular microenvironment modulates biological activity of diffusible growth factors during early mouse embryogenesis” 47rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2014 年
- ⑲ 松尾 勲 「細胞外マトリックス分子による哺乳動物初期胚の細胞運命・動態の制御機構」第 4 回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting, 2014 年
- ⑳ 松尾 勲、下川 佳代、平松 竜司、木村-吉田 千春 「細胞外マトリックス分子を介したマウス初期胚の細胞運命・動態の制御機構」第 87 回日本生化学会年会, 2014 年
- ㉑ 平松竜司、木村-吉田 千春、松尾 勲 「マウス胚の前後軸形成における胚と母体子宮組織間の力学的相互作用」第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年

〔図書〕(計 1 件)

- ① 松尾 勲
頭尾軸・背腹軸形成 pp. 304-307
公益社団法人日本動物学会〔編〕『動物学の百科事典』
2018 年 9 月 30 日発行 丸善出版

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.wch.opho.jp/research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉田 千春

ローマ字氏名：Yoshida, Chiharu

所属研究機関名：地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター（研究所）

部局名：病因病態部門

職名：主任研究員

研究者番号 (8 桁)：60360666

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：上田 陽子

ローマ字氏名：Ueda, Yoko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。